بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم شهربانو رستمی رشته **خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی تغییرات القاء شده توسط آرسنیک تری اکساید در پروفایل بیان miRNA سلولهای لوسمی پرومیلوسیتی حاد** » در تاریخ **۱۳۹۱/۴/۲۱** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر سعید آبرون	
استاد راهنمای دوم	دکتر کامران علی مقدم	
استاد مشاور	دکتر مهرداد نوروزی نیا	
استاد ناظر	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد ناظر	دکتر یوسف مرتضوی	
استاد ناظر	دکتر احمد قره باغیان	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید کاویانی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه(اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب شهربانو رستمی دانشجوی رشته هماتولوژی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۶ مقطع دکتری دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم .»

شهربانو رستمی

۹۱/۴/۲۴

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمیپژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

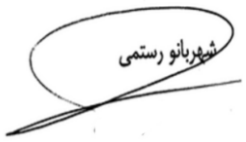
" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته هماتولوژی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر سعید آبرون و دکتر کامران علی مقدم ، مشاوره دکتر مهرداد نوروزی نیا از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب شهربانو رستمی دانشجوی رشته هماتولولوژی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.



۹۱/۴/۲۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.)در رشته هماتولوژی

عنوان

بررسی تغییرات القاء شده توسط آرسنیک تری اکساید در پروفایل بیان miRNA سلولهای لوسمی پرومیلوسیتی حاد

نگارش

شهربانو رستمی

اساتید راهنما

دکترسعید آبرون

دکتر کامران علی مقدم

استاد مشاور

دکتر مهرداد نوروزی نیا

بهار ۱۳۹۱

تقدیم به :

پدر بزرگوار و مادر مهربانم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت ، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی ها و مشکلات بوده است .

تشکر و قدردانی

سپاس از استاد فرهیخته و بزرگوار جناب آقای دکتر آبرون کـه در طـی تحصـیل صـبورانه تجربیـات علمی و ارزشمند خود را در اختیارم قرار دادند.

از استاد فرزانه جناب آقای دکتر علی مقدم که علم ، دانـش و تخصـص خـود را بـی دریـغ ارزانـی ام داشتند کمال سپاس و تشکر را دارم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر نوروزی نیا که از راهنمائی هـای علمـی ارزشمندشـان در ایـن دوره بهره مند شدم سپاسگزاری می نمایم.

از همسرم که در تمامی لحظات رفیق راه است و در سایه همیاری و همدلی او به ایـن منظـور نائـل شدم صمیمانه تشکر می نمایم.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام خانم ها حبیبه قدیمی،اعظم زغل ، نسـرین علیـزاد و کلیه پرسنل آزمایشگاه پیوند سلولهای بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی که مرا صـمیمانه و مشـفقانه یاری دادند.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نمودند.

چکیده:

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) زیر گروه خاصی از لوسمی میلوئیدی حاد (AML)است که مشخصه بارز آن جابجائی کروموزومی(15;17)(q22;q12-21)t با ایجاد ژن الحاقی PML/RARA است.با معرفی درمانهای جدید مانند ATRA و آرسنیک تری اکساید(As2O3)، APL از یک بیماری بسیارکشنده به یک بیماری بسیار درمان پذیر تبدیل شده است. اثر ضد لوسمی As2O3 هم in vivo و هم in vito کاملا ثابت شده است ولی مکانیسم عملکرد آن هنوز به خوبی روشن نشده است.ریزRNAها (miRNAs) نقش مهمی در آپوپتوز، تمایز، تومورزائی و حساسیت دارویی دارند. با این حال نقش miRNAs در اثر ضد سرطانی As2O3 در لوسمی حاد قبلا مطالعه نشده است. در این مطالعه نقش بالقوه miRNA در القاء اثرات ضد سرطانی As2O3 در رده های سلولی NB4، HL-60 و بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد به دنبال درمان مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد سلولهای موجود در فاز اولیه آپوپتوز با استفاده از تست Annexin Vدر سلولهای NB4 و HL-60 به ترتیب در غلظت های ۲ و ۲۰ میکرومول از As2O3 مشاهده شد.در بیماران درصد سلولهای Annexin V+/PI- در بیماران مختلف به میزان قابل توجهی متفاوت بود(طیف ۲۱-۳ درصد). با استفاده از تکنیک میکروواری مشخص شد که به ترتیب ۳۳ و ۱۴۴miRNAs در رده های سلولی NB4 و HL-60 نسبت به نمونه ای بدون تیمار تغییرات بیش از ۱/۵ برابری پیدا کردند. ۳۱ مورد از این miRNAs تغییر بیان یافته در هر دو رده سلولی مشترک بودند. از تکنیک Realtime PCR برای تایید نتایج میکروواری شش miRNAs (miR-20a* ، miR-22 ، miR-125b، miR-183، miR-326، miR-299-5p) انتخابی استفاده شد. در همه موارد بجز miR-299-5p تغییرات مشاهده شده در میکروواری و Realtime PCR مشابه بود. از miRNAs تایید شده افزایش بیان miR-22 در هر ۵ بیمار APL درمان شده با As2O3 هم تایید شد. اهداف بالقوه miRNAs با استفاده از نرم افزارهای PicTar ، TargetScan و Diana microT پیش بینی شد و در نهایت مجموعه ای از ژنهای هدف بدست آمد که در روندهای مهم بیولوژیکی مانند آپوپتوز، تنظیم سیکل سلولی، تکثیر سلولی، تهاجم و تمایز درگیرند. در مجموع اطلاعات ما نشان داد As2O3 تغییرات قابل توجهی در پروفایل بیان miRNA سلولهای APL و غیر APL ایجاد می کند. به نظر می رسد As2O3 حداقل بخشی از فعالیت ضد توموری خود را از طریق تغییر در الگوی بیان miRNAs اعمال می کند.

کلمات کلیدی: As2O3، miRNAs، لوسمی پرومیلوسیتی حاد

فهرست منابع:

فصل اول : مقدمه

۱-۱- لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) ۱

۱-۱-۱- ساختار و نقش بیولوژیکی Retinoic Acid Receptor-α (RARα) ۱

۱-۱-۲- ساختمان و نقش بیولوژیکی Promyelocytic Leukemia(PML) ۳

۱-۱-۳- پاتوفیزیولوژی APL ۵

۱-۱-۴- مدل بازبینی شده پاتوژنز APL ۶

۱-۱-۵- روشهای تشخیص APL ۹

۱-۱-۶- درمان APL ۹

۱-۱-۷- فاکتورهای پیش آگهی در APL ۱۱

۱-۲- آرسنیک تری اکساید ۱۳

۱-۲-۱- تاریخچه استفاده از داروهای آرسنیکی و متابولیسم های آن ۱۳

۱-۲-۲- تاثیر آرسنیک بر روی سیگنال دهی سلولی ۱۶

۱-۲-۲-۱- مسیر سیگنال دهی پروتئین کینار ۱۶

۱-۲-۲-۲- تیروزین فسفاتازها ۱۶

۱-۲-۲-۳- مهارکیناز IkB و NFkB ۱۷

۱-۲-۲-۴- تاثیر آرسنیک بر روی وضعیت Redox سلولی و پاسخ استرس سلولی ۱۷

۱-۲-۲-۵- کاسپازها و آپوپتوز ۱۸

۱-۳- آپوپتوز.. ..... ۲۰

۱-۳-۱- مسیرهای آپوپتوز ۲۰
۱-۴- ریز RNAها(MicroRNA) ۲۴
۱-۴-۱- بیوژنز و عملکرد ۲۴
۱-۴-۲- نامگذاری miRNAs ۲۸
۱-۴-۲- miRNAs و آپوپتوز ۲۹
۱-۴-۲-۱- چند miRNA آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می دهند؟ ۲۹
۱-۴-۲-۲- آیا miRNA را می توان به صورت پروآپوپتوتیک یا آنتی آپوپتوتیک طبقه بندی کرد؟ ۳۰
۱-۵- هدف تحقیق ۳۴

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱- کشت سلول ۳۷
۲-۱-۱- مواد و وسایل لازم ۳۸
۲-۱-۲- روش کار: کشت سلولی NB4 و HL-60 در حضور غلظتهای مختلف As2O3 ..... ۳۹
۲-۱-۲-۱- طرز تهیه محیط کشت RPMI ۳۹
۲-۱-۳- طرز تهیه استوک (محلول اصلی) آرسنیک تری اکساید ۴۰
۲-۲- تعیین درصد سلولهای زنده با استفاده از معرف MTT ۴۰
۲-۲-۱- مواد لازم جهت تهیه محلول MTT ۴۱
۲-۲-۲- روش انجام آزمایش ۴۱
۲-۳- نمونه گیری از بیماران ۴۲
۲-۴- بررسی آپوپتوز ۴۳
۲-۴-۱- مواد مورد نیاز ۴۳

۲-۴-۲- روش انجام آزمایش ۴۴
۲-۵-۱- مواد مورد نیاز ۴۶
۲-۵-۲- آماده سازی بافر متصل کننده(binding Buffer) ۴۶
۲-۵-۳- لیبل کردن مگنتیک با میکروبیدهای Annexin V ۴۶
۲-۶- تخلیص RNA ۴۷
۲-۶-۱- مواد و محلولهای لازم ۴۷
۲-۶-۲- روش کار ۴۸
۲-۷-۱- بیوآنالایزرBioanalyzer ۴۹
۲-۷-۲- نانودراپ ۵۰
۲-۸- miRNA Microarray ۵۰
۲-۹- تایید نتایج miRNA Microarray ۵۱
۲-۹-۱-روش کار ۵۲
۲-۹-۱-۱- تیمار کردن RNA استخراج شده با DNase ۵۲
۲-۹-۱-۱-۱- مواد و محلولهای لازم ۵۲
۲-۹-۱-۱-۲- روش کار ۵۲
۲-۹-۲- ساخت cDNA ۵۳
۲-۹-۲-۱-مواد و محلولهای لازم ۵۳
۲-۹-۲-۲-روش کار ۵۳
۲-۹-۳- مرحله Q-PCR ۵۴
۲-۹-۳-۱-مواد و محلولهای لازم ۵۴

۲-۹-۳-۲-روش کار ۵۵
۲-۹-۳-۳- روش آنالیز اطلاعات در Real-Time PCR ۵۶
۲-۱۰- بررسی ژن هدف mRNA به روش Realtime-PCR ۵۷
۲-۱۰-۱- مواد و وسایل لازم جهت ساخت cDNA ۵۷
۲-۱۰-۲- روش کار ۵۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج بررسی فعالیت متابولیک سلولی (MTT assay) ۶۱
۳-۲- بررسی آپوپتوز به روش AnnexinV در رده های سلولی NB4 و HL-60 ..... ۶۳
۳-۳- بررسی آپوپتوز القاء شده توسط AS2O3 در بدن بیماران APL تحت درمان ۶۷
۳-۳- نتیجه جدا سازی سلولهای +Annexin V به روش میکروبید ۷۵
۳-۴- نتایج بررسی کیفیت RNA ۷۶
۳-۴- نتایج میکروواری ۷۷
۳-۴-۱-نتایج کنترل کیفی array: ۷۹
۳-۴-۱-۱- نتایج کنترل کیفی مرحله لیبل شدن اسلاید اری با استفاده ازSpike-ins ۷۹
۳-۴-۱-۲- نرمالایزه کردن نتایج ۸۰
۳-۴-۲- نتایج میکروواری ۸۱
۳-۴-۲-۱- تغیرات بیان miRNAs در سلولهای HL-60 تیمار شده با µM ۲ آرسنیک تری اکساید ۸۲
۳-۴-۲-۲- تغییرات بیان miRNAs در سلولهای HL-60 تیمارشده با ۲۰µM به مدت ۲۴ ساعت. ۸۴
۳-۴-۲-۳- تغییرات بیان miRNAs در سلولهای NB4 تیمار شده با ۲µM به مدت ۲۴ ساعت. ۸۸
۳-۴-۲-۴-miRNAs که بیان آنها به به صورت مشترک افزایش یا کاهش یافته است ۸۸

۳-۵- تایید نتایج Microarray ۹۳

۳-۵-۱- نتایج Realtime PCR ۹۳

۳-۵-۲- تایید نتایج میکروواری رده های سلولی تیمار شده با As2O3 به روش Realtime PCR ۹۸

۳-۵-۳- تایید نتایج میکروواری در نمونه مغز استخوان بیماران تحت درمان با As2O3 ..... ۱۰۱

۳-۵-۴- مقایسه میزان بیان miR-125b و miR-22 ..... ۱۰۲

۳-۶- پیش بینی واکنش miRNA-mRNA ۱۰۳

۳-۶-۱- نتایج پیش بینی تعداد ژن و مسیرهائی که هدف miRNAs تایید شده قرار می گیرند ۱۰۶

۳-۷- نتایج بررسی تغییرات بیان SIRT1 ..... ۱۱۱

فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادات

فهرست منابع ۱۳۴

ضمیمه الف ۱۴۶

فهرست جداول

جدول ۱-۱- فراوانی جابه جائی های کروموزومی مختلف در بیماران APL ۲

جدول ۱-۲- فاکتورهای پیش آگهی در بیماران APL ۱۳

جدول ۱-۳- آرسنیک در طبیعت ۱۴

جدول۱-۴- شاخص های ریخت شناسی و بیوشیمیائی آپوپتوز ۲۱

جدول۲-۱- مقادیر RIN اندازه گیری شده با دستگاه بیوآنالایزر۲۱۰۰ ..... ۴۹

جدول ۲-۲- مقدار مواد مورد نیاز برای تیمار کردن RNA استخراج شده با DNase ۵۳

جدول۲-۳- مواد مورد نیاز برای واکنش نسخه بردار معکوس ۵۴

جدول۲-۴- مواد مورد نیاز برای تکثیر miRNAs بوسیله Realtime PCR ۵۵

جدول۲-۵- برنامه زمانی و دمایی استفاده شده برای مراحل miRNAs Real-time PCR ۵۷

جدول۲-۶- تهیه Master Mix برای یک واکنش سنتز cDNA ۵۸

جدول ۲-۷- توالی پرایمرهای استفاده شده و اندازه ناحیه تکثیری ۵۹

جدول ۳-۱- غلظت مهاری ۵۰ درصد هر دو رده سلولی ۶۳

جدول۳-۲- ویژگیهای بیماران مورد مطالعه ۶۸

جدول۳-۳- درصد سلولهای AnnexinV+/PI- در بیماران تحت درمان با AS2O3 ..... ۶۹

جدول ۳-۴- نتایج جدا سازی سلولها ی Annexin V+ به روش میکروبید ۷۶

جدول۳-۵- مقادیر RIN برای هر یک از نمونه های ارسالی ۷۶

جدول ۳-۶- همبستگی کلیه Spike in های بین اسلایدهای مختلف ۷۹

جدول۳-۷- لیست miRNAs کاهش بیان یافته به دنبال تیمار با ۲ میکرومول ۸۴

جدول۳-۸- لیست miRNAs کاهش بیان یافته به دنبال تیمار با ۲۰ میکرومول ۸۶

جدول۳-۹- لیست miRNAs کاهش بیان یافته به دنبال تیمار با۲۰ میکرومول HL-60 ..... ۸۷

جدول ۳-۱۰- لیست miRNAs افزایش یا کاهش بیان یافته به دنبال تیمار با NB4..... ۸۹

جدول۳-۱۱- لیست miRNAs که بیان آنها به دنبال تیمار با As2O3 در دو رده سلولی..... ۹۱

جدول۳-۷- ابزارهای پیش بینی miRNAs ۱۰۵

جدول ۳-۱۲- تعداد ژنهای پیش بینی شده ۱۰۶

جدول ۳-۱۴-لیست انکوژنهائی که با استفاده از نرم افزارmiRANDA ۱۰۷

فهرست نمودارها:

نمودار۳-۱- تغییرات شمارش گلبولهای سفید (/μL) در خون محیطی بیماران در طی درمان ۶۸

نمودار۳-۲- تغییرات بیان فیوژن PML/RARA در بیماران APL به دنبال درمان با As2O3 ..... ۶۹

نمودار۳-۳- تایید نتیجه میکروواری برای miR-210 ..... ۹۹

نمودار۳-۴- تایید نتیجه میکروواری برای رده سلولی HL-60 ..... ۱۰۰

نمودار۳-۵- تایید نتیجه میکروواری در رده سلولی NB4 ..... ۱۰۰

نمودار۳-۶- بررسی تغییرات بیان miR-183 ، miR-326، miR-22 در نمونه مغز استخوان ۱۰۱

نمودار۳-۷- بررسی تغییرات بیان *miR-20a ، miR-125b در نمونه مغز استخوان ۱۰۲

نمودار۳-۸-مقایسه میزان بیان miR-22 و miR-125b در ۴ گروه ۱۰۳

نمودار ۳-۹-تغییرات بیان SIRT1 و miR-22 ..... ۱۱۱

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ - دامین های عملکردی پروتین RARα ۳

شکل ۱-۲ - دومن های عملکردی در پروتئین PML ۴

شکل ۱-۳-مدل کلاسیک پاتوژنز APL. ۶

شکل ۱-۴- تصویر شماتیک از تجزیه PML/RARA در اثر RA و As2O3 ..... ۸

شکل ۱-۵- تصویر شماتیک از مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز. ۲۳

شکل ۱-۶ - نحوه پردازش pri-miRNA ۲۶

شکل۱-۷- بیوژنز miRNA ۲۷

شکل ۲-۱-تصویر شماتیک از احیای رنگ MTT به فورمازون ۴۱

شکل۲-۲- تفکیک سلولهای موجود در فاز اولیه آپوپتوز از سلولهای موجود در فاز نهائی آپوپتوز ۴۳

شکل۳-۳- تمایز سلولهای مرده و آپوپتوزی در رده سلولی HL-60 ..... ۶۶

شکل ۳-۴- نتایج بررسی in vivo آپوپتوز در بیمار شماره ۱ ..... ۷۰

شکل ۳-۵- نتایج بررسی in vivo آپوپتوز در بیمار شماره ۲ ..... ۷۱

شکل ۳-۶- نتایج بررسی in vivo آپوپتوز در بیمار شماره ۳ ..... ۷۲

شکل-۳-۷- نتایج بررسی in vivo آپوپتوز در بیمار شماره ۴ ..... ۷۳

شکل۳-۸- نتایج بررسی in vivo آپوپتوز در بیمار شماره ۵ ..... ۷۴

شکل۳-۹- نتیجه بررسی کیفیت RNA توسط دستگاه بیوآنالایزر. ۷۷

شکل ۳-۱۰- روش رفرانس مشترک ۷۸

شکل۳-۱۱ :نمودار MA رسم شده برای نمونه ها ۸۱

شکل۳-۱۲- heat map ۲۲ مورد miRNAs تغییر بیان یافته در سلولهای HL-60 ..... ۸۳

شکل۳-۱۳-heat map ۱۴۴ مورد miRNAs تغییر بیان یافته در سلولهای HL-60 ..... ۸۵

شکل۳-۱۴-heat map ۳۳ مورد miRNAs تغییر بیان یافته در سلولهای NB4 به دنبال تیمار ۹۰

شکل۳-۱۵- heat map ۳۱ مورد miRNAs که بیان آنها به دنبال تیمار با As2O3 در دو رده ۹۲

شکل۳-۱۶- منحنی ذوب ۹۵

شکل ۳-۱۷- بررسی اثر بخشی پرایمرها ۹۷

شکل۳-۱۸ : منحنی های تکثیر (Amplification) ۹۸

شکل۳-۱۹ : اهداف miR-125b که ار نظر تجربی به تایید رسیده اند ۱۱۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL):

لوسمی پرومیلوسیتی حاد(Acute Promyelocytic Leukemia) زیر گروه خاصی از لوسمی میلوئیدی حاد(AML) می باشد که در حدود ۱۰ درصد از موارد آن را شامل می شود و از نظر مرفولوژی در طبقه بندی FAB به عنوان AML-M3 شناخته می شود[۱]. از نظر سایتوژنتیکی سلولهای APL در بیش از۹۵ درصد موارد دارای جابجائی کروموزومی دو طرفه کروموزوم های ۱۵ و ۱۷ هستند. در نتیجه این جابجائی ژن PML (Promyelocytic Leukemia) کروموزوم ۱۵ به ژن RARα کروموزوم ۱۷ ملحق می شود. جابجائی های کروموزومی واریانت(جدول ۱-۲) در حدود ۲ درصد از بیماران APL شناسائی می شود.

۱-۱-۱- ساختار و نقش بیولوژیکی(Retinoic Acid Receptor-α (RARα:

رسپتورهای اسید رتینوئیک که شامل دو خانواده مجزا می شود (RXRs ,RARs) تنظیم کننده های رشد جنینی میباشند، این رسپتورها همچنین رشد و تمایز را در انواع سلولهای افراد بالغ تحت تاثیر قرار می دهند. این رسپتورها فاکتور های نسخه برداری هستند که مستقیماً به صورت هترودایمر RAR-RXR به توالی های اختصاصیِ عناصر پاسخ دهنده به اسید رتینوئیک(RARE) واقع در ناحیه تنظیمی ژنهای هدف خاصی متصل می شوند.